AP55

การคัดแยกและลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ

Screening and Morphology Characterization of Thermophilic and Halophilic Bacteria from Low Sodium Fish Sauce

ศุภณัฐ หวังรุ่งเรืองกิจ พชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์* และณฐมล จินดาพรรณ
Suppanat Hwangrungruangkij, Pacharawat Dilokpatwanich, Ampun Chaikulsareewath*
and Nathamol Chindapan
ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม 38 ถนนเพชรเกษม แขวงบางหว้า
เขตภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160
**ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: ampun.cha@siam.edu*

บทคัดย่อ

ในกระบวนการผลิตน้ำปลาโซเดียมต่ำด้วยวิธีการแยกสารผ่านด้วยเยื่อไฟฟ้าระดับห้องปฏิบัติการ มีความจำเป็นต้องให้ความร้อนกับน้ำปลาโซเดียมต่ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการกำจัดเกลือ ก่อนการบรรจุขณะร้อนในภาชนะปิดสนิท เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามหากต้องการผลิตในเชิงการค้าจำเป็นต้องทราบชนิดและการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียที่จะใช้เป็นดัชนีกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อที่ถูกต้อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการคัดแยกและแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำรวมทั้งศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยทดลองให้ความร้อนแก่น้ำปลาโซเดียมต่ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำมาคัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธี Pour plate บนอาหารแข็ง Plate Count Agar (PCA) ซึ่งเติมเกลือให้มีความเข้มข้นร้อยละ 3, 5, 14 และ 18 และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากการทดลองพบโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ เจริญได้บนจานเพาะเชื้อ PCA ที่เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 เท่านั้น เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรมและย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ติดสีแกรมบวก มีลักษณะท่อน และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียชนิดหนึ่งมีค่า D_{75} , D_{85} และ D_{95} เท่ากับ 34.38, 27.03 และ 11.19 ตามลำดับ และมีค่า Z เท่ากับ 40.98

คำสำคัญ: *น้ำปลาโซเดียมต่ำ แบคทีเรียชอบเกลือ แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง*

Abstract

In low-sodium fish sauce production using electrodialysis (ED) in the laboratory-scale, it is necessary to heat the low-sodium fish sauce at temperature 100°C for 10 minute, to destroy microorganism contamination during ED desalination before hot filling in a sealed container, to obtain the shelf stable low-sodium fish sauce. However, if scale-up to the commercial production, it should to know a type and thermal resistance of bacteria used as index for processing establishment. The objective of this research was to study screening and morphology characterization of thermophilic halophilic bacteria from low-sodium fish sauce, and their thermal resistance was also investigated. The low-sodium fish sauce was heated at temperature 90°C for 25 minute. The bacteria were then isolated from the heated low-sodium fish sauce by pour plate on plate count agar (PCA) with salt concentration of 3%, 5%, 14% and 18%, and incubated at temperature 55 °C for 24-48 hour. The result showed that bacteria only grow in PCA with 3% salt concentration, which could be identified in three different single colony of bacteria. Studying morphology of isolated bacteria by Gram staining and endospore staining, they were Gram-positive bacteria, had rod shape and endospore. Moreover, D_{75} D_{85} D_{95} values of one bacteria were equal to 34.38, 27.03 and 11.19 respectively and Z-Value was equal to 40.98.

Keywords: *Low sodium fish sauce, Halophilic bacteria, Thermophilic bacteria*

บทนำ

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสที่มีลักษณะเป็นของเหลว ใส สีแดงมีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัว ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในประเทศไทย โดยน้ำปลาเกิดจากกระบวนการหมักปลาไส้ตัน (anchovies) หรือปลาซาร์ดีน (sardines) กับเกลือสมุทร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตน้ำปลาจะประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์สูงไม่น้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง เป็นที่ทราบดีว่าการได้รับโซเดียมคลอไรด์มากเกินความต้องการของร่างกายเป็นสาเหตุให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ด้วยเหตุนี้ทำให้น้ำปลากลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคซึ่งมีปัญหาด้านสุขภาพจำเป็นต้องหลีกเลี่ยง แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการผลิตน้ำปลาโซเดียมต่ำโดยใช้ โปแตสเซียมคลอไรด์ทดแทนโซเดียมคลอไรด์แล้วก็ตาม แต่ไม่สามารถใช้ทดแทนได้ในปริมาณมากนัก เนื่องจากถ้าใช้โปแตสเซียมคลอไรด์มากเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสขม ผู้บริโภคไม่ยอมรับและผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังคงไม่เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคไตบางชนิด

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงนำไปสู่การผลิตน้ำปลาโซเดียมต่ำโดยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโซเดียมคลอไรด์ออกจากน้ำปลาให้เหลือเพียงร้อยละ 14 โดยกระทบต่อคุณภาพน้อยที่สุด (Chindapan และคณะ 2009; Chindapan และคณะ 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าการลดลงของโซเดียมคลอไรด์ทำให้ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของน้ำปลาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (อลิษา และปจาวลีย์ 2556) ซึ่งอาจกระทบต่อคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารทางด้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคชนิดทนเกลือได้สูงกว่าร้อยละ 14 เช่น *Staphylococcus aureus* ที่ทนเกลือได้สูงถึงร้อยละ 20 (FDA 2001) และยังอาจเสี่ยงต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10-12 (FDA 2001) อีกทั้งเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชอบเกลือบางชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย และสามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือระหว่างร้อยละ 15-20 จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการให้ความร้อนแก่น้ำปลาโซเดียมต่ำในระดับห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด (อลิษา และปจาวลีย์, 2556) อย่างไรก็ตามหากต้องการขยายการผลิตในระดับโรงงานจำเป็นต้องทราบชนิดของแบคทีเรียที่จะใช้เป็นดัชนีกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อที่ถูกต้อง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการคัดแยกและแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ และศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อนำไปใช้กำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อน้ำปลาโซเดียมต่ำในระดับโรงงานต้นแบบ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

น้ำปลาซึ่งจัดซื้อโดยบริษัท ไมท์ตี้ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด จะถูกขนส่งมายังโรงงานโดยบรรจุในถังพลาสติกปิดสนิทขนาด 30 ลิตร ในปริมาณที่เพียงพอสำหรับแต่ละการทดลอง น้ำปลาที่ใช้นี้มีค่า pH ระหว่าง 5.2-5.3 ความหนาแน่นประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณเกลือร้อยละ 25.0-25.3 โดยน้ำหนัก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 38.3% โดยน้ำหนัก ไนโตรเจนทั้งหมด 2.0% โดยปริมาตร น้ำปลามีน้ำตาลอมแดง (L^*=43.0 ค่า a^*=14.1 ค่า b^*=53.2)

2. การเตรียมตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำ

เตรียมตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำโดยใช้เครื่องแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (Pilot-scale electrodialysis) ซึ่งถูกออกแบบให้ทำงานเป็นกะและประกอบด้วยเซลล์แยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (PCCell, model ED 1000 H, Heusweiler, Germany) ที่มีพื้นที่แลกเปลี่ยนไอออนทั้งหมด 8 ตารางเมตร ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำจะเริ่มจากบรรจุน้ำปลาที่มีโซเดียม คลอไรด์ร้อยละ 25 จำนวน 90 ลิตร ลงในถังสารละลายเจือจาง (diluate) และบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 90 ลิตร ลงในถังสารละลายเข้มข้น (concentrate) สำหรับถังบรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ จะเติมด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.25 โมลต่อลิตร ซึ่งถูกปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดซัลฟิวริกจนมี pH เท่ากับ 2.5 จำนวน 90 ลิตร จากนั้นเปิดปั๊มเพื่อดูดสารละลายทั้ง 3 ชนิด ผ่านเซลล์แยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้าและหมุนเวียนกลับเข้าสู่ถังประมาณ 1 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศก่อนทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 15.5 แอมแปร์ ปล่อยให้น้ำปลาหมุนเวียนในระบบนาน 240 นาที เก็บตัวอย่างน้ำปลาออกจากระบบเพื่อนำมาวัดปริมาณเกลือโดยใช้วิธี Volhard method (AOAC, 1995) และวัดค่า วอเตอร์แอคติวิตี้โดยใช้ water activity meter (Aqualab, model CX3TE, Pullman, USA) ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดโดยใช้ Hand-held refractometer (Atago, model S-28, Tokyo, Japan) และปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1995) หลังจากทำการทดลองเสร็จจะล้างระบบด้วยวิธีการทำความสะอาดภายใน (Clean-In-Place) ตามวิธีการของเจนวิทย์ จันดี (2554)

3. การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ

3.1 การเตรียมน้ำปลาโดยการให้ความร้อน

นำน้ำปลาโซเดียมต่ำซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือ ร้อยละ 14 ปริมาตร 1 ลิตร มาให้ความร้อนโดยใช้อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ขณะที่ทำการให้ความร้อนจะควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ thermocouple และ data logger

3.2 การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผ่านการให้ความร้อน

คัดแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการ Pour Plate นำตัวอย่างน้ำปลาที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (normal saline) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ ten-fold dilution จนได้ความเจือจาง 10^0 และ 10^{-1} จากนั้นปิเปต สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงบนจานอาหารเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมอาหารเพาะเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3, 5, 14 และ 18 ตามลำดับ ที่หลอมเหลวจนได้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงไปในจานเพาะเชื้อ ทำการผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาด รูปร่าง ขอบหรือริมของโคโลนี พื้นผิว ความสูงนูน ความขุ่น และการสร้างสีของโคโลนี นำลักษณะโคโลนีที่เหมือนกันมาศึกษาต่อโดยการศึกษาการติดสีแกรม และการติดสีเอนโดสปอร์ ตามวิธีของ Harrigan. (1998)

4. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ

วิธีการศึกษาดัดแปลงมาจากวิธีของ สโรชา จันทร์เพ็ญ และคณะ (2554)

4.1 นำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาโซเดียมต่ำ No.3 มาเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมหัวเชื้อที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำปลาที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 14 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาให้ความร้อนโดยใช้อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ขณะที่ทำการให้ความร้อนจะควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ thermocouple และ data logger

4.2 เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เจือจางเชื้อจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม และเลี้ยงเชื้อที่เหลือรอดด้วยวิธี Pour plate บนอาหารเพาะเชื้อ Standard plate count agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่า Colony Forming Unit (CFU)/มิลลิลิตร

4.3 คำนวณค่า D-Value จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU ต่อมิลลิลิตร) กับเวลา หาสมการเส้นตรงเพื่อนำมาคำนวณหาค่า D โดยค่า D = - 1/slope ของแต่ละอุณหภูมิที่ให้ความร้อน

4.4 คำนวณค่า z-value จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า D กับอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน ได้กราฟการท้าลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน (thermal destruction curve, TDC หรือ thermal death time curve, TDT) หาสมการเส้นตรงเพื่อน้ำมาคำนวณหาค่า z (z-value) โดยค่า z = - 1/slope

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการเตรียมน้ำปลาโซเดียมต่ำ

จากการนำตัวอย่างน้ำปลาที่ประกอบด้วยเกลือเริ่มต้น ร้อยละ 25 มาผ่านกระบวนการแยกสารผ่านเยื่อไฟฟ้า ที่ 15.5 แอมแปร์ เป็นเวลา 240 นาที มาวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของน้ำปลา ได้ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติต่างๆ ของตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำ

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	วอเตอร์แอคติวิตี้
24.8	14.23 ± 0.74	6.23 ± 0.06	0.874 ± 0.003

จากตารางที่ 1 พบว่าน้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผลิตได้จากการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 14.23 และค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ 0.874 จากการลดลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของน้ำปลาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจะกระทบต่ออายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของอาหารทางด้านจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคชนิดทนเกลือได้สูงกว่าร้อยละ 14 เช่น *Staphylococcus aureus* ที่ทนเกลือได้สูงถึงร้อยละ 20 (FDA 2001) และยังอาจเสี่ยงต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่

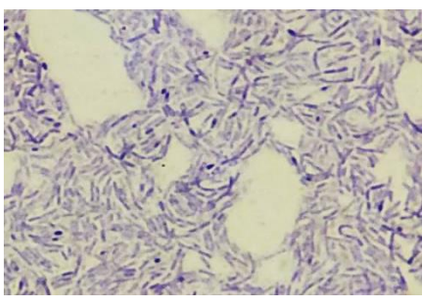
เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10-12 (FDA 2001) รวมทั้งจุลินทรีย์ชอบเกลือชนิดต่างๆที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียซึ่งโดยทั่วไปสามารถทนความร้อนได้สูงกว่าจุลินทรีย์ก่อโรค

2. ผลการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ

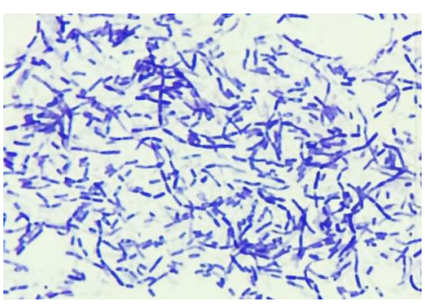
จากการทดลองคัดแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำ ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 14 หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที โดยวิธี pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น ร้อยละ 3, 5, 14 และ 18 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบแบคทีเรียเจริญบนอาหารเพาะเชื้อ PCA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 เท่านั้น โดยพบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ส่วนอาหารเพาะเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นอื่นจะไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ และศึกษาลักษณะการติดสีแกรม และการติดสีเอนโดสปอร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และลักษณะการติดสีแกรม ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม และการติดสีเอนโดสปอร์ ของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง

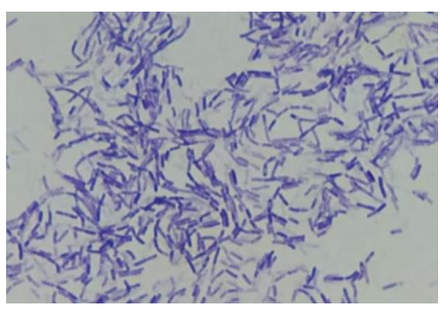
รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ย้อมสีแกรม	ย้อมสีเอนโดสปอร์
1	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่นอน ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้า พื้นผิวขรุขระ นูนโค้งเล็กน้อย สีขาวขุ่น	แกรมบวก	สร้างเอนโดสปอร์
2	โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ พื้นผิวเรียบ นูนโค้งเล็กน้อย สีเหลืองอ่อนขุ่น	แกรมบวก	สร้างเอนโดสปอร์
3	โคโลนีลักษณะตกกิ่งก้าน คล้ายราก ขอบซ้อนกันเป็นคลื่นหยัก พื้นผิวขรุขระ หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร สีขาวขุ่น	แกรมบวก	สร้างเอนโดสปอร์



ไอโซเลท 1



ไอโซเลท 2



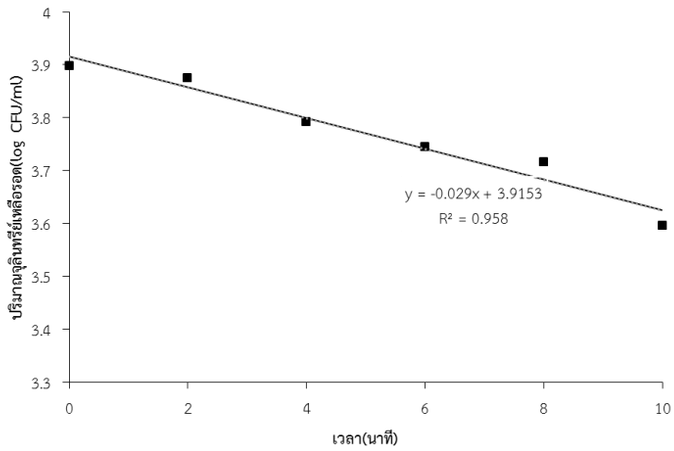
ไอโซเลท 3

ภาพที่ 1 การติดสีแกรมของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง

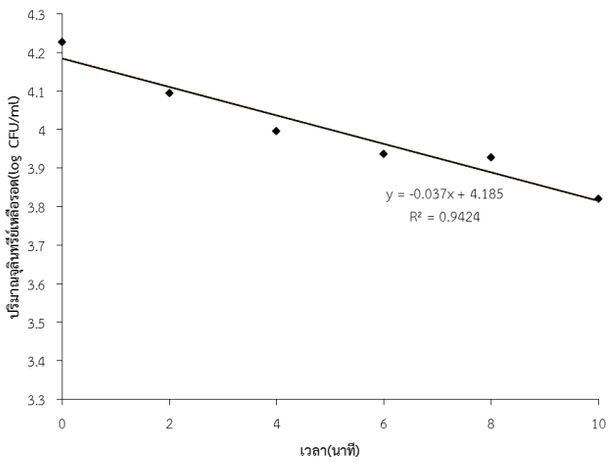
จากตารางที่ 2 และภาพที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยที่ทั้ง 3 สายพันธุ์ติดสีแกรมบวก และสร้างเอนโดสปอร์ทั้งหมด ซึ่งเอนโดสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมา เพื่อทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงมีผลทำให้ทนต่อความร้อนที่ใช้ในการทดลอง และทนต่อเกลือที่ความเข้มข้นสูงได้ จากการทดลองคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ จัดเป็นพวก slightly halophilic bacteria เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ0.5-3 (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2554)

3. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ

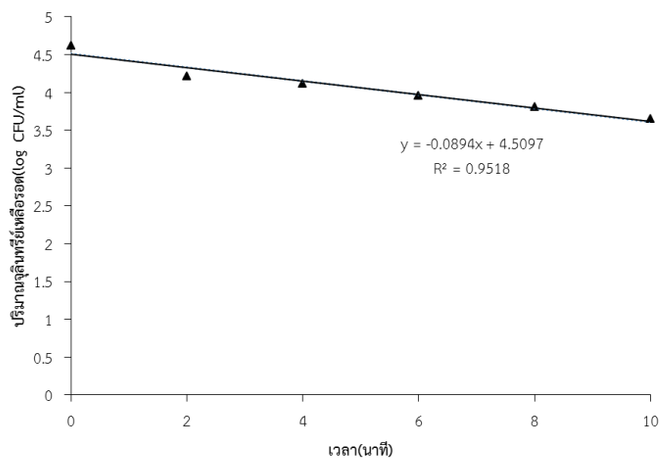
จากการนำแบคทีเรีย ไอโซเลท.3 ที่คัดแยกได้มาศึกษาความสามารถในการต้านทานความร้อน โดยเติมลงในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 14 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำปลาที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที มานับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีทำ pour plate ได้ผลการทดลองดังกราฟภาพที่ 2



75 องศาเซลเซียส



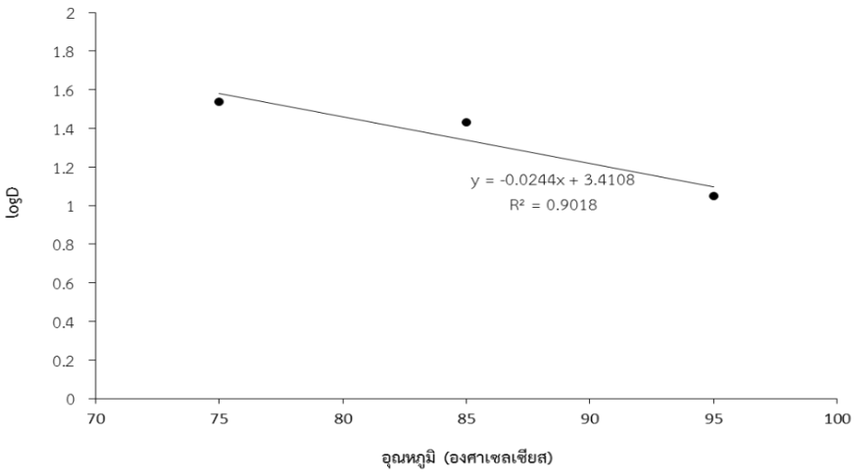
85 องศาเซลเซียส



95 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียไอโซเลท 3 ที่เหลือรอด หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กับเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน

จากภาพที่ 2 พบว่าอุณหภูมิและเวลามีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยจำนวนของแบคทีเรียจะลดลงเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้น จำนวนแบคทีเรียจะลดลงแบบเอ็กโพเนนเชียล โดย logCFU/ml กับเวลามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง เมื่อคำนวณค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (D-value) พบว่าแบคทีเรีย ไอโซเลท 3 ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส มีค่า D 34.38, 27.03 และ 11.19 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อใช้เวลานานขึ้น ค่า D จะมีค่าลดลง แสดงว่าแบคทีเรียมีความต้านทานความร้อนลดลง และเมื่อมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น ค่า D มีค่าลดลงตรงตามทฤษฎี ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการฆ่าเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการใช้อุณหภูมิสูง จุลินทรีย์จะถูกทำลายได้เร็วขึ้น และจะใช้เวลาในการให้ความร้อนน้อยลงอีกด้วย (ทิพาพร ~~อยู่วิทย~~, 2535) และเมื่อคำนวณ ค่า Z ของแบคทีเรีย จากกราฟ Thermal death time ดังภาพที่ 3 ค่า Z เท่ากับ 40.98 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) โดยทั่วไปค่า Z จะบอกถึงความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่ระดับต่างกัน



ภาพที่ 3 Thermal death time curve ของแบคทีเรียไอโซเลท 3 ที่คัดแยกได้

ตารางที่ 3 ค่า D-value และ Z-value ของแบคทีเรียไอโซเลท 3 ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 14 เมื่อให้ความร้อนที่ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย	D-value (นาที)			Z-value (°C)
	75 °C	85 °C	95 °C	
No.3	34.38	27.03	11.19	40.88

สรุป

งานวิจัยฉบับนี้จึงทำการศึกษาการคัดแยกและลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ โดยนำน้ำปลาโซเดียมต่ำมาทำลายเชื้อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำมาคัดแยกเชื้อ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ โดยทั้ง 3 สายพันธุ์มารถเจริญได้ในอาหารเพาะเชื้อ PCA ที่เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน โดยที่ทั้ง 3 สายพันธุ์ ติดสีแกรมบวก มีลักษณะท่อน และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท 3 ที่คัดแยกได้มาศึกษาการต้านทานความร้อน โดยใส่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ ความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 14 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านการให้ความร้อน จากนั้นคำนวณหาค่า D ได้เท่ากับ 34.38, 27.03 และ 11.19 ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียจะมีความต้านทานความร้อนที่ลดลง ตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และมีค่า Z เท่ากับ 40.98 เมื่อได้ทราบค่าการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียแล้ว จะสามารถนำค่าที่ได้ไปใช้เป็นดัชนีกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อที่ถูกต้องต่อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทไมท์ตี้อินเตอร์เนชันแนล จำกัด ที่อนุเคราะห์ให้ตัวอย่างน้ำปลามาใช้ในการทดลอง และเตรียมน้ำปลาโซเดียมต่ำ และคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ที่อนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เจนวิทย์ จันดี. (2554). *การพัฒนาเครื่องแยกสารผ่านด้วยเยื่อไฟฟ้าระดับโรงงานต้นแบบสำหรับการผลิต*. ภาควิทยานิพนธ์ ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพมหานคร.

ทิพาพร อยู่วิทยา. (2535). การกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน. *วารสารอาหาร,* 22(4): 39-50.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, และนิธิยา รัตนาปนนท์. *แบคทีเรียที่ชอบเกลือ.* ค้นเมื่อ 23 เมษายน 2558, จากศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร เว็บไซต์: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1377/halophilic-bacteria-แบคทีเรียที่ชอบเกลือ

สโรชา จันทร์เพ็ญ, จิตศิริ ราชตนะพันธุ์ และศศิธร ตรงจิตภักดี. (2554). การศึกษาความต้านทานความร้อนของ *Pichia kudriavzevii* TISTR 5147 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5110 ในน้ำมะนาว. *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 49. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554*. (หน้า 556-563). กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อลิษา โพธิ์ใบ, และปจาวลีย์ จันแดง. (2556). *ศึกษาผลของพาสเจอไรเซชั่นที่มีต่อคุณภาพของน้ำปลาโซเดียมต่ำซึ่งผลิตจากกระบวนการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า.* ภาคนิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม, กรุงเทพมหานคร.

AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th ed). Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.

Chindapan, N., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2009). Electrodialysis desalination of fish sauce: electrodialysis performance and product quality. *Journal of Food Science, 74,* E363-E371.

Chindapan, N., Devahastin, S., Chiewchan, N., & Sablani, S.S. (2011). Desalination of fish sauce by electrodialysis: Effect on selected aroma compounds and amino acid compositions. *Journal of Food Science, 76,* S451-S457.

FDA. (2001). Table #A-1: Limiting conditions for pathogen growth. Appendix 4, *In* fish and fishery products hazards and controls guide, 3rd ed., p. 281, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Seafood. Washington, DC.

Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology.* USA: Academic press.

Silva, F.V.M., & Gibbs, P.A. (2010). Non-proteolytic *Clostridium botulinum* spores in low-acid cold distributed foods and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology, 21*, 95-105.